

УДК 591.81:611.984-001.5-089.84.001.6

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ ГРУБОВОЛОКНИСТОЙ КОСТНОЙ ТКАНИ В ДИСТРАКЦИОННОМ РЕГЕНЕРАТЕ БОЛЬШЕБЕРЦОВОЙ КОСТИ ПРИ УДЛИНЕНИИ ГОЛЕНИ

Ирьянов Ю.М., Ирьянова Т.Ю., Петровская Н.В.

Гос. учреждение науки Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А.Илизарова, Курган

Исследована функциональная морфология грубоволокнистой костной ткани distractionных регенератов большеберцовых костей 38 собак при удлинении голени методом чрескостного distractionного остеосинтеза. Используются методы гистохимии, трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии и рентгеновского электронно-зондового микроанализа. Установлено, что грубоволокнистая костная ткань формируется индуцибельными периваскулярными остеогенными клетками, обладающими значительным пролиферативным потенциалом и остается слабо минерализованной на протяжении всего периода удлинения. Остеобласты и остециты биосинтетически активны и ориентированы по вектору distraction, что обеспечивает быстрый продольный рост регенератов.

Анализ влияния механических факторов на процессы морфогенеза, установление их роли в формообразовательных процессах – одна из наиболее актуальных задач современной морфологии, решение которой имеет важнейшее научно-практическое значение для разработки способов управления репаративно-восстановительными процессами [3, 4, 8].

Distraction – строго дозированное, стабилизированное в заданном направлении растяжение сопоставленных костных отломков является одним из специфических видов механического воздействия на репаративное костеобразование и широко используется при лечении повреждений и заболеваний костей аппаратами для чрескостного остеосинтеза.

Известно, что по организации костного матрикса и межклеточного вещества костная ткань классифицируется на два гистологических типа: незрелую и зрелую. Зрелая пластинчатая, тонковолокнистая костная ткань образует губчатое и компактное костное вещество большинства дефинитивных плоских и трубчатых костей. Ее строение, функция и химический состав изучены достаточно подробно. [6]. Незрелая костная ткань исследована значительно меньше. Она является главным образом в эмбриогенезе и в раннем постнатальном онтогенезе, при энхондральном костеобразовании и формировании компактного слоя длинных трубчатых костей. У взрослых незрелая костная ткань располагается в зубных альвеолах, вблизи черепных швов, в костном лабиринте внутреннего уха, в участках прикрепления к костям сухожилий и связок, а

также при заживлении переломов и в быстро растущих костных опухолях [10]. Единой, общепринятой классификации незрелой костной ткани в настоящее время не существует. Некоторые авторы полагают, что формируется только один тип незрелой костной ткани – ретикулофиброзная или грубоволокнистая [6], другие – выделяют два типа незрелой костной ткани: грубоволокнистую и сетчатую [10]. Ряд авторов различает три типа: незрелой костной ткани: грубоволокнистую или пучковую, сетчато-волоконную и параллельно-волоконную [5]. При чрескостном distractionном остеосинтезе морфологические особенности незрелой костной ткани, формируемой индуцибельными и детерминированными остеогенными стромальными клетками костного мозга [2, 4], изучены недостаточно.

Цель работы – морфофункциональный анализ грубоволокнистой костной ткани, формирующейся в регенерате большеберцовой кости при удлинении голени методом чрескостного distractionного остеосинтеза.

Материал и методы. 38 взрослым собакам под внутривенным тиопенталовым наркозом удлинляли голень методом чрескостного distractionного остеосинтеза. Distraction осуществляли через 5 суток после флексии остеоклазии берцовых костей с суточным темпом 0,75 – 1 мм за 3 – 4 приема. Животных эвтаназировали внутривенным введением летальных доз 5% тиопентала натрия. через 3 и 5 суток после операции (в предdistractionном периоде), через 3, 7, 14, 21 и 28 суток distraction. Большеберцовые кости фиксировали 2 % растворами параформальдеги-

да и глутаральдегида, кусочки регенератов до-фиксируют в 1 % четырехоксида осмия и заливают в аралдит. На полутонких срезах проводят ШИК-реакцию с докрасиванием метиленовым синим. Для оценки пролиферативной активности преosteобластов определяют их митотический индекс (относительное число фигур митоза на 1000 ядер преosteобластов в 10 объектах) [9]. Ультратонкие срезы после контрастирования уранилацетатом и цитратом свинца изучают при помощи трансмиссионного электронного микроскопа «JEM-100B». По методу тестового точечного счета осуществляют ультраструктурометрию костных клеток [1]. После изготовления срезов аралдит с поверхности блоков удаляют 5% раствором этиолята натрия, блоки напыляют серебром в ионном напылителе «IB-6» и изучают в сканирующем электронном микроскопе «JSM-840». На рентгеновском электронно-зондовом микроанализаторе «LINK 860-500» определяют содержание в образцах костной ткани кальция, фосфора и серы. Количественные данные обрабатывают статистически.

Результаты и обсуждение. Проведенные исследования показали, что дистракционные регенераты большеберцовых костей приобретают характерную объемно-пространственную организацию и зональный тип строения, сохраняющийся до конца периода удлинения. В регенерате формируется пять зон: у концов костных фрагментов - зона сфероидальных костных трабекул, вокруг линии излома - слабоминерализованная срединная прослойка. Между ними образуется зона продольно ориентированных первичных остеонов, растущих в прослойку навстречу друг другу со стороны проксимальной и дистальной зон сфероидальных трабекул..

На различных этапах эксперимента, в различных зонах регенератов выявлены три гистологических типа незрелой костной ткани: ретикулофиброзная (сетчато-волоконная), грубоволоконная (параллельно-волоконная) и пучковая. Грубоволоконная и ретикулофиброзная костные ткани образуются уже на 3 – 5-е сутки после операции. В этот период в регенерате отчетливо выявляются трабекулы двух типов: ретикулофиброзные, локализованные у эндостальной поверхности концов отломков, имеющие прямолинейную или сфероидальную форму и спиралевидно-ветвящиеся, заполняющие большую часть костномозговой полости отломков и медуллярное пространство регенератов, образованные грубоволоконной костной тканью. Пучковая костная ткань появляется в регенерате значительно позднее, через 7 - 14 суток дистракции.

В преддистракционном периоде трабекулы грубоволоконной костной ткани соединяют

концы отломков слабоминерализованным костно-остеоидным сращением с содержанием кальция $1,45 \pm 0,01$ %.

С конца первой недели дистракции и до конца периода удлинения спиралевидные трабекулы грубоволоконной костной ткани вырастают в дистракционный диастаз, образуют срединную прослойку и формируют первичные остеоны лакунарной или цилиндрической формы. Строение грубоволоконной костной ткани в этот период эксперимента однотипно и не претерпевает существенных изменений. Фиброархитектоника характеризуется упорядоченной пространственной организацией, при которой коллагеновые фибриллы в волокнах и волокна в пучках ориентированы параллельно друг другу и располагаются циркулярно по периферии трабекул и продольными слоями в стенках первичных остеонов.

Остеогенные клетки грубоволоконной костной ткани дистракционного регенерата относятся к индуцибельным стромальным клеткам костного мозга и являются фибробластоподобными периваскулоцитами, остеогенные свойства которых проявляются только после действия определенных индукторов [2, 12], в данном случае – дистракции. Преosteобласты грубоволоконной костной ткани располагаются в радиусе 20-30 мкм от сосуда. Митотический индекс преosteобластов составляет $2,83 \pm 0,11$ % на 7-е сутки дистракции и $3,86 \pm 0,15$ % на 28-е сутки, что достоверно выше ($P < 0,01$) по сравнению с известными литературными данными, полученными при исследовании особенностей пролиферации остеогенных клеток в зонах эндостального и энхондрального остеогенеза в пренатальном и постнатальном онтогенезе [7], составляющими от $1,0 \pm 0,12$ % до $2,1 \pm 0,1$ %.

Остеобласты располагаются кластерами по 2-3 клетки, что характерно именно для индуцибельных остеогенных клеток [11]. Они имеют фибробластоподобную, полигональную форму и многочисленные цитоплазматические отростки, разветвляющиеся между пучками толстых (до 1-2 мкм в диаметре) коллагеновых волокон, ориентированных параллельно друг другу (рис.1 а, б). Данные трансмиссионной электронной микроскопии и ультраструктурометрии указывают на значительную биосинтетическую активность не только остеобластов, но и остеоцитов.. Объемные доли органоидов биосинтетического аппарата: гранулярной эндоплазматической сети и полисом составляют в остеобластах: $34,1 \pm 0,9$ % и $19,7 \pm 0,7$ % соответственно, а в остеоцитах незначительно меньше - $30,2 \pm 0,7$ % и $15,6 \pm 0,7$ %. Это свидетельствует о том, что рост грубоволоконной костной ткани осуществляется не только

за счет циркулярной и продольной аппозиции, но и по типу интерстициального процесса.

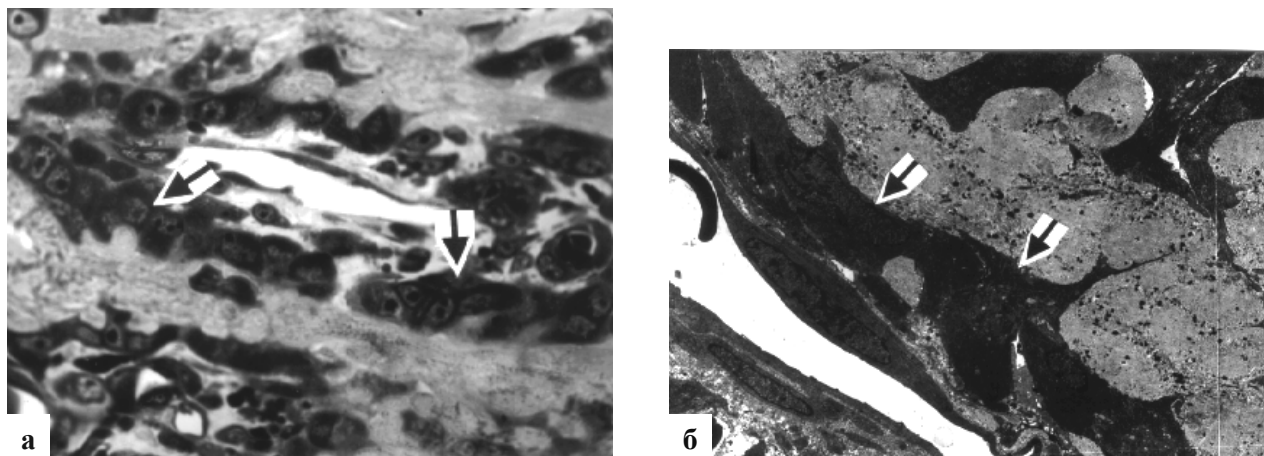


Рисунок 1. Трабекулы грубоволокнистой костной ткани. Стрелками отмечены остеобласты. 7 суток дистракции.

а – полутонкий срез, ШИК-реакция, метиленовый синий; б – электронограмма.

Увеличение: а – 500; б – 5000.

Перицеллюлярные пространства остеобластов ограничивают слой остеоида, где аккумулируются нейтральные гликопротеины и новообразованные коллагеновые фибриллы. В ходе дифференцировки остеобласты отдаляются от сосудов и располагаются слоями по периферии трабекул, примыкая вплотную к пучкам коллагеновых волокон. Остеоциты грубоволокнистой костной ткани сохраняют фибробластоподобную форму и связь друг с другом и с остеобластами при помощи системы цитоплазматических отростков, проходящих между пучками плотно упакованных коллагеновых волокон. В срединной прослойке регенерата остеоциты располагаются концентрическими слоями вокруг кровеносных капилляров синусоидного типа, а в первичных остеонах образуют изогеноподобные группы - кластеры, состоящие из 2-3 клеток, вертикальными колонками располагающиеся между пучками параллельно ориентированных коллагеновых волокон. Остеоциты сохраняют многие ультраструктурные признаки фибробластоподобных остеобластов, в том числе имеют хорошо выраженный биосинтетический аппарат. Морфологически они неоднородны. В вершинах первичных остеонов остеоциты сходны по своей ультраструктуре с коллагенобластами первого типа и содержат конденсированные митохондрии, многочисленные полисомы и свободные рибосомы. В вертикальных колонках остеоциты приобретают строение, характерное для коллагенобластов второго типа и аккумулируют в вакуолеподобных структурах комплекса Гольджи и расширенных цистернах гранулярного эндоплазматического ретикулума хлопьевидный или

мелкозернистый ШИК-положительный материал.

Кальцификация грубоволокнистой костной ткани характеризуется рядом особенностей. Инициальная кальцификация осуществляется без участия матриксных везикул непосредственно в коллагеновых фибриллах, в тех участках волокон, где выявляется ШИК-положительное вещество (нейтральные гликопротеины). В кальцифицирующихся зонах концентрируются игловидные кристаллы костного минерала, скопления которых принимают форму звездчатых друз, располагающихся хаотично вдоль волокон. В участках, более удаленных от срединной прослойки, кальцифицирующиеся зоны постепенно сливаются, однако формирования сплошного фронта минерализации вокруг остеоцитов не наблюдается.

Результаты исследований минерального состава трабекул грубоволокнистой костной ткани свидетельствуют о слабой их минерализации в течение всего периода дистракции, что обеспечивает регенератам высокую степень пластичности. Так через 14 суток дистракции содержание кальция, фосфора и серы в грубоволокнистой костной ткани составляет (в весовых процентах): $2,24 \pm 0,10$, $1,40 \pm 0,06$ и $0,22 \pm 0,01$ соответственно. Слабая степень минерализации объясняется разобщенностью ядер кристаллизации гидроксипатита, располагающихся изолированными группами по ходу цитоплазматических отростков остеобластов и остеоцитов и по периферии коллагеновых волокон, при этом центральная часть последних остается наименее минерализованной. При слиянии кальцифицирующихся зон вокруг остеоцитов в последних появляются признаки

деструкции. Цитоплазма заполняется многочисленными вторичными лизосомами и аутофагосомами, отмечается пикноз ядер, уплотнение цитоплазмы, вакуолизация митохондрий. Остеоциты некротизируются и распадаются на нитевидные структуры, которые постепенно исчезают среди минерализованных пучков коллагеновых волокон. Лишенные остеоцитов зоны окружаются остеобластами следующих генераций.

Заключение. В дистракционном регенерате, формирующемся при удлинении конечности, значительное развитие получает грубоволокнистая костная ткань, которая образует первичные остеоны, а в периферических участках срединной прослойки - спиралевидные трабекулы. Грубоволокнистая костная ткань сохраняет слабую степень минерализации в течение всего периода дистракции, что обеспечивает регенерату высокую степень пластичности. Остеогенные клетки этого типа костной ткани - индуцибельные периваскулярные клетки с остеогенными потенциальными обладают значительной пролиферативной и биосинтетической активностью. Остеобласты и остеоциты ориентированы в костных структурах по вектору дистракции, вдоль длинной оси кости и осуществляют костеобразование не только за счет циркулярной и продольной аппозиции, но и по типу интерстициального процесса, что способствует быстрому продольному росту регенерата и удлинению оперированной конечности.

Литература

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М.: Медицина, 1990. 384 с.
2. Гололобов В.Г., Деев Р.В. //Морфология. 2003. Том 123. № 1. С. 9.

3.. Илизаров Г.А., Ирьянов Ю.М. //Бюлл. эксп. биол. и мед. 1991. Т. 111. № 2. С. 194.

4. Ирьянов Ю.М. Репаративное костеобразование в условиях дистракционного остеосинтеза: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Иркутск, 1996. 33 с.

5. Микроскопическая техника: Руководство. /Под ред. Саркисова Д.С., Перова Ю.Л. М.: Медицина, 1996. 544 с.

6. Ревелл П.А. Патология кости. М.: Медицина, 1993. 368 с.

7. Родионова Н.В. Функциональная морфология клеток в остеогенезе. Киев: Наук. думка, 1989. 192 с.

8. Шевцов В.И., Ирьянов Ю.М. //Бюлл. эксп. биол. и мед. 1995. Т. 63. № 7. С. 95.

9. Хлопонин П.А., Патюченко О.Ю. //Морфология. 2003. Т. 123. № 1. С. 50.

10. Хэм А., Кормак Д. Гистология. М.: Мир, 1983. Т. 3. 293 с.

11. Long M.W., Robinson J.A., Ashcraft E.A. and Mann K.G. J. Clin. Invest. 1995 v. 95. № 2. P. 881.

12. Wlodarski K.N. Clin. Orthop. 1990. v. 252. P. 276.

Ирьянов Юрий Михайлович д.б.н., г.н.с. ГУН РНЦ «ВТО». 640020, Курган, ул. Куйбышева, 5, кв.34.

тел.; сл.(352-22)53-51-43; д. (352-22)46-63-16, e-mail: irianova@mail.ru

Ирьянова Татьяна Юрьевна м.н.с. ГУН РНЦ «ВТО»

Петровская Наталья Виловна к.м.н., в.н.с. ГУН РНЦ «ВТО».

Functional morphology of the rough-fibrillar bone tissue in the tibial distraction regenerate bone during leg lengthening

Irianov Y.M., Irianova T.Y., Petrovskaya N.V.

State Science Institution - Russian Ilizarov Scientific Center "Restorative Traumatology and Orthopaedics", Kurgan

Functional morphology of the rough-fibrillar bone tissue of the tibial distraction regenerate bones was studied in 38 dogs in the process of leg lengthening using the technique of transosseous distraction osteosynthesis. The method of histochemistry, that of transmission and scanning electron microscopy, as well as the method of roentgen electron-probe microanalysis was used. It was shown, that rough-fibrillar tissue was formed by inducible perivascular osteogenic cells with great proliferative potential and remained poorly mineralized throughout the period of lengthening. Osteoblasts and osteocytes were active biosynthetically and oriented along the vector of distraction, thereby providing fast longitudinal growth of the regenerate bones.